



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais



**Pesquisa e quantificação do transcrito *BCR-ABL* em amostras de sangue total, neutrófilos e células CD34+. Sua relação com a resposta à terapêutica**

**Ana Raquel da Silva Gonçalves Carvalho**

Coimbra

2018



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais



Instituto Politécnico  
de Coimbra

## **Pesquisa e quantificação do transcrito *BCR-ABL* em amostras de sangue total, neutrófilos e células CD34+. Sua relação com a resposta à terapêutica**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada por Ana Raquel da Silva Gonçalves Carvalho, sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva.

## **Júri**

Doutor Fernando José Figueiredo Agostinho D'Abreu Mendes, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutora Emília Nobre Barata Roxo Cortesão, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

## **Agradecimentos**

Ao Doutor Artur Paiva, pela orientação e dedicação na correção deste trabalho, bem como pelas sugestões dadas.

À Doutora Margarida Coucelo, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante o estudo. Agradeço também pelos ensinamentos e pela sua enorme disponibilidade.

À Doutora Ana Teresa Simões, por todos os ensinamentos, apoio e incentivo.

Ao Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, que permitiram o desenvolvimento do meu estudo.

À minha Filha Mariana, que iniciou este percurso académico “comigo”. Penso que será, no futuro, uma especialista em Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, pois o seu entusiasmo durante as aulas era notório. Apesar de ter sido muito difícil ter sido mãe durante este meu percurso, foi sem dúvida, o meu maior incentivo para terminar.

Ao meu Marido Marco, por todo o apoio, carinho e confiança que sempre me deu ao longo de todo o meu percurso académico.

Agradeço aos meus Pais e Irmão, sem o apoio dos quais esta dissertação nunca teria sido possível.

## Resumo

**Introdução:** Atualmente, o tratamento da Leucemia mielóide crónica (LMC) baseia-se na utilização de inibidores tirosina-cinase que inibem a proteína oncogénica BCR-ABL. A avaliação da resposta à terapêutica é efetuada, de acordo com recomendações internacionais, através da monitorização da percentagem de transcritos *BCR-ABL* no sangue total. [23]

**Objetivos:** Quantificar, num grupo de doentes com LMC, os níveis de transcritos *BCR-ABL* nas populações de neutrófilos e células CD34+ isoladas por *cell-sorting* e comparar com os resultados obtidos em amostras de sangue total.

**Material e métodos:** Foram estudados 15 doentes com LMC, sob tratamento com imatinib, 6 do sexo feminino e 9 do sexo masculino. A média de idade ao diagnóstico foi de 56 anos (42-85 anos). As amostras utilizadas foram sangue total e populações de neutrófilos e células CD34+ separadas por *cell-sorting*. A pesquisa e quantificação dos transcritos *BCR-ABL* foram efetuadas por PCR Multiplex e PCR em Tempo Real Quantitativo (RQ-PCR), respetivamente.

**Resultados:** Foram detetados transcritos *BCR-ABL* em 6 amostras de cDNA de sangue total. Nos neutrófilos e CD34+, apenas 2 amostras de cDNA apresentavam transcritos detetáveis. Observou-se uma ligeira correlação positiva entre o número de cópias de ABL no sangue total e neutrófilos. Não foram detetadas cópias de *BCR-ABL* em 6 amostras de neutrófilos e em 7 amostras de CD34+. Verificou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa em relação ao número de cópias *BCR-ABL* para os valores de sangue total, neutrófilos e CD34+. A média de %*BCR-ABL/ABL* foi de 1,94% em sangue total, com 1 doente com uma %*BCR-ABL/ABL*>10%, 3 doentes entre 1-10%, 9 doentes <0,1% e num 1 doente não foi possível determinar a %*BCR-ABL/ABL*. Nos neutrófilos, a média de %*BCR-ABL/ABL* foi de 32,39%, 6 doentes apresentavam uma %*BCR-ABL/ABL*>10%, 2 doentes entre 1-10%, 1 doente <0,1% e em 6 doentes não foi possível determinar a %*BCR-ABL/ABL*. Nas células CD34+, a média de %*BCR-ABL/ABL* foi de 37,3625%, 5 doentes com %*BCR-ABL/ABL*>10%, 1 doente entre 1-10%, 2 doentes <0,1% e 7 doentes com %*BCR-ABL/ABL* indeterminadas. Ainda assim, observou-se uma correlação positiva entre os valores obtidos no sangue total e neutrófilos ( $p<0,0001$ ,  $r=0,9412$ ) e uma correlação ligeira entre os valores de neutrófilos e CD34+ ( $p=0,044$ ,  $r=0,52$ ). Globalmente, a %*BCR-ABL/ABL* determinada em sangue total foi inferior à obtida quando avaliada em neutrófilos e células CD34+.

**Discussão:** Na quantificação do *BCR-ABL*, observou-se uma discrepância entre o número de cópias de ABL, sendo muito superiores nas amostras de sangue total. Estas diferenças podem ser justificadas por um rendimento significativamente inferior no processo de extração de RNA nas amostras obtidas após por separação celular, em comparação com as amostras preparadas a partir de sangue total. Em relação à %*BCR-ABL/ABL*, nas amostras de sangue total, os doentes com maior percentagem de transcritos nas amostras de sangue total são aqueles que apresentavam menor tempo de tratamento. Nas amostras de *cell-sorting*, em 8 doentes, a %*BCR-ABL/ABL* foi

superior à obtida em sangue total. Em 3 amostras de células CD34+ e neutrófilos, de doentes com RM>4.0, verificou-se que a %*BCR-ABL/ABL* e o número de transcritos *BCR-ABL* apresentaram resultados superiores em relação às amostras de sangue total. Deste modo, revelaram-se resultados interessantes, no caso de estes doentes serem futuros candidatos a interromperem a terapêutica.

**Conclusão:** A determinação da expressão de *BCR-ABL* em células CD34+ poderá ser um dado adicional importante para avaliar os doentes enquanto potenciais candidatos a paragem terapêutica. No entanto, serão necessários mais estudos para confirmar estes achados e avaliar qual a sua utilidade no diagnóstico e eventual estratégia terapêutica.

**Palavras-chave:** Leucemia Mieloide Crónica, LMC, *BCR-ABL*, Inibidores das tirosina-quinases, imatinib, Neutrófilos, CD34+

## Abstract

**Introduction:** Currently, CML treatment is based on the use of tyrosine kinase inhibitors that inhibit oncogenic protein BCR-ABL. Assessment of response to therapy is performed according to international recommendations by monitoring the percentage of *BCR-ABL* transcripts in whole blood. [23]

**Objectives:** In a group of patients with chronic myeloid leukemia, quantify levels of *BCR-ABL* transcripts in neutrophil and CD34+ isolated cells by cell-sorting and compare with the results obtained in whole blood samples.

**Material and methods:** Fifteen patients with CML under treatment with imatinib, 6 females and 9 males were studied. The average age at diagnosis was 56 years (42-85 years). The samples used were whole blood and neutrophil and CD34+ cells separated by *cell-sorting*. The research and quantification of the *BCR-ABL* transcripts were performed by PCR Multiplex and Real-time Quantitative PCR (RQ-PCR), respectively.

**Results:** *BCR-ABL* transcripts were detected in 6 whole blood cDNA samples. In neutrophils and CD34 +, only 2 cDNA samples had detectable transcripts. There was a slight positive correlation between the number of copies of *ABL* in whole blood and neutrophils. No copies of *BCR-ABL* were detected in 6 neutrophil samples and in 7 CD34+ samples. There was a statistically significant positive correlation with *BCR-ABL* copy numbers for whole blood, neutrophil and CD34+ values. The average of %*BCR-ABL/ABL* was 1.94% in whole blood, with 1 patient with a %*BCR-ABL/ABL*>10%, 3 patients between 1-10%, 9 patients <0.1% and in respect of 1 patient it was not possible to determine the %*BCR-ABL/ABL*. In neutrophils, the average %*BCR-ABL/ABL* was 32.39%, 6 patients had a %*BCR-ABL/ABL*> 10%, 2 patients between 1-10%, 1 patient <0.1% and in respect of 6 patients it was not possible to determine the %*BCR-ABL/ABL*. In CD34+ cells, average %*BCR-ABL/ABL* was 37.3625%, 5 patients with a %*BCR-ABL/ABL*>10%, 1 patient between 1-10%, 2 patients <0.1% and 7 patients with %*BCR-ABL/ABL* indeterminate. Nevertheless, a positive correlation was observed between values obtained in whole blood and neutrophils ( $p<0,0001$ ,  $r=0,9412$ ) and a slight correlation between neutrophil and CD34+ values ( $p=0,044$ ,  $r=0,52$ ). Overall, the %*BCR-ABL/ABL* determined in whole blood was lower than that obtained when evaluated on neutrophils and CD34+ cells.

**Discussion:** In the *BCR-ABL* quantification, a discrepancy between the number of *ABL* copies was observed, being much higher in the whole blood samples. These differences can be justified by a significant lower yield in the RNA extraction process in the samples obtained after cell separation compared to the samples prepared from whole blood. Regarding %*BCR-ABL/ABL*, in the whole blood samples, the patients with the highest percentage of transcripts in the whole blood samples were those with the shortest treatment time. In the cell-sorting samples, in 8 patients, %*BCR-ABL/ABL* was higher than that obtained in whole blood. In 3 samples of CD34+ and neutrophil cells from patients with RM>4.0, %*BCR-ABL/ABL* and the number of *BCR-ABL* transcripts were found to have superior results compared to the whole blood samples.

Thus, interesting results were shown in case these patients are considered as future candidates to discontinue therapy.

**Conclusion:** Determination of *BCR-ABL* expression in CD34+ cells may be an important additional data to evaluate potential patients who are candidates for stopping therapy. However, further studies will be needed to confirm these findings and to evaluate their usefulness in diagnosis and eventual therapeutic strategy.

**Keywords:** Chronic Myeloid Leukemia, LMC, BCR-ABL, Inhibitors of tyrosine kinase, imatinib, Neutrophils, CD34+



## Índice

RESUMO.....	IV
ABSTRACT .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE TABELAS .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA .....	1
1.1.1 O Cromossoma Filadélfia (Ph).....	1
1.1.2 Diagnóstico e Manifestações Clínicas.....	5
1.1.3 Tratamento da LMC.....	7
1.1.3.1 Evolução do tratamento.....	7
1.1.3.2 Resposta ao tratamento.....	9
1.1.4 Resposta Molecular Profunda.....	10
1.1.4.1 Relevância clínica da resposta molecular profunda.....	11
1.1.4.1.1 Fatores que influenciam a obtenção de resposta molecular profunda Terapêutica.....	12
1.1.4.2 Alteração precoce de tratamento .....	13
1.1.4.3 Resposta molecular completa e remissão livre de tratamento .....	14
1.1.4.3.1 Fatores modificadores da duração da remissão livre de tratamento.....	16
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO .....	19
3.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS <i>BCR-ABL</i> .....	20
3.2.1 Preparação das Amostras.....	20
3.2.2 Extração de RNA Total .....	21
3.2.3 Quantificação RNA.....	22
3.2.4 RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction).....	22
3.2.5 PCR- Multiplex para identificação de transcritos <i>BCR-ABL</i> .....	22
3.2.6 PCR-Simples para identificação dos transcritos <i>e13a2</i> e <i>e14a2</i> .....	23
3.2.6.1 Electroforese em gel de agarose.....	23
3.2.7 PCR em Tempo Real Quantitativo (RQ-PCR).....	24
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 PESQUISA DO TRANSCRITO <i>BCR-ABL</i> .....	26
4.2 QUANTIFICAÇÃO DO TRANSCRITO <i>BCR-ABL</i> .....	28
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Formação do Cromossoma Filadélfia (Ph) .....	2
<b>Figura 2</b> - Domínios Funcionais do produto do Gene <i>ABL</i> .....	3
<b>Figura 3</b> - Domínios funcionais do produto do Gene <i>BCR</i> .....	4
<b>Figura 4</b> - Localização dos pontos de quebra do gene <i>ABL</i> e <i>BCR</i> .....	4
<b>Figura 5</b> - Hematopoiese na Fase Crónica e na Crise Blástica da LMC.....	6
<b>Figura 6</b> - <i>International Scale</i> - Níveis de resposta citogenética e molecular. ....	10
<b>Figura 7</b> - Electroforese em gel de agarose 2% dos produtos do PCR-Multiplex.....	26
<b>Figura 8</b> - Electroforese em gel de agarose 2% dos produtos do PCR-Simples .....	27
<b>Figura 9</b> - Correlação entre o número de cópias <i>BCR-ABL</i> das diferentes populações.....	30
<b>Figura 10</b> - Correlação entre a percentagem <i>BCR-ABL/ABL</i> das diferentes populações. ....	31
<b>Figura 11</b> - Percentagem de <i>BCR-ABL/ABL</i> nas diferentes populações. ....	32

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Definições de fase acelerada e crise blástica segundo a ELN .....	7
<b>Tabela 2</b> - Resposta ao tratamento segundo a ELN .....	14
<b>Tabela 3</b> - Identificação e características clínicas população em estudo. ....	19
<b>Tabela 4</b> - Primers utilizados para pesquisa dos transcritos BCR-ABL. ....	22
<b>Tabela 5</b> - Mistura PCR Multiplex para transcritos BCR-ABL. ....	23
<b>Tabela 6</b> - Primers utilizados para pesquisa dos transcritos BCR-ABL. ....	23
<b>Tabela 7</b> - Primers e sonda utilizados para transcritos BCR-ABL1 Major “e13a2” e “e14a2” .....	24
<b>Tabela 8</b> - Primers e sonda para gene controlo ABL1.....	24
<b>Tabela 9</b> - Mistura para transcritos Major BCR-ABL 1 (p210). ....	24
<b>Tabela 10</b> - Mistura para gene controlo ABL1. ....	25
<b>Tabela 11</b> - Detecção dos transcritos e13a2 e e14a2 nas diferentes populações celulares. ....	28
<b>Tabela 12</b> - Resultados obtidos pela quantificação do transcrito <i>BCR-ABL</i> . ....	29

## Lista de abreviaturas

**ABL** - *Abelson*

**CCR** - Resposta citogenética completa (*Complete Cytogenetic Response*)

**CEC** - Células estaminais cancerígenas

**CHR** - Resposta hematológica completa (*Complete Hematologic Response*)

**CP** - Fase Crónica (*Chronic phase*)

**CPM** - Células progenitoras multipotentes

**BC** - Crise Blástica (*Blast crisis*)

**BCR** - *Breakpoint cluster region*

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**ELN** - European Leukemia Net

**ENESTnd** - Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials – Newly Diagnosed Patients

**FSC** - *Forward Scatter Channel*

**GEF** - *Guanine nucleotide exchange factors*

**GAP** - *GTPase activating proteins*

**IFN- $\alpha$**  - Interferão- $\alpha$

**IS** - International Scale

**LLA** - Leucemia Linfoblástica Aguda

**LMC** - Leucemia Mielóide Crónica

**Log** - Logaritmo

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucleico mensageiro

**M-bcr** - *Major breakpoint cluster region*

**m-bcr** - *Minor breakpoint cluster region*

**NADPH** - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

**NCCN** - National Comprehensive Cancer Network

**PBS** - Tampão fosfato

**Ph** - Cromossoma Filadélfia (*Philadelphia Chromosome*)

**p190** - peso molecular 190 quilodaltons

**p210** - peso molecular 210 quilodaltons

**p230** - peso molecular 230 quilodaltons

**RMC** - resposta molecular completa

**RMM** - Resposta molecular major

**RT-PCR** - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

**TKIs** - Inibidores da tirosina quinase

**SSC** - Side Scatter Channel

**μ-bcr** - *Micra breakpoint cluster region*

# 1. Introdução

## 1.1 Leucemia Mielóide Crônica

A Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa da célula estaminal, que se caracteriza pelo crescimento descontrolado das células hematopoiéticas resultando na expansão clonal, em particular da linhagem mieloide. [1, 2, 3] As células precursoras clonais proliferam e originam uma população de células mielóides, em vários estádios de maturação. [4]

Descrita pela primeira vez em 1845 pelos patologistas Bennet, Craigie e Virchow, [5] a LMC foi a primeira doença neoplásica a ser associada a uma alteração cromossômica adquirida - o cromossoma Philadelphia (Ph). [6] Este cromossoma resulta de uma translocação equilibrada recíproca entre o cromossoma 9 e o cromossoma 22, t(9;22) (q34;q11) [7] e dá origem ao oncogene de fusão *BCR-ABL*. O produto de expressão do oncogene é a proteína BCR-ABL, uma tirosina cinase com atividade constitutiva, que mais tarde se mostrou ser o princípio patogénico da LMC. [8]

Considerada uma doença rara, a LMC tem uma incidência mundial de 1-2 novos casos por 100 000 habitantes por ano e representa cerca de 20% das leucemias de adultos. [3]

Embora a doença atinja todas as faixas etárias, a idade média de diagnóstico varia entre os 45 e os 60 anos de idade. [9] Esta doença atinge mais os homens do que as mulheres, numa proporção 1,4:1. [9, 10]

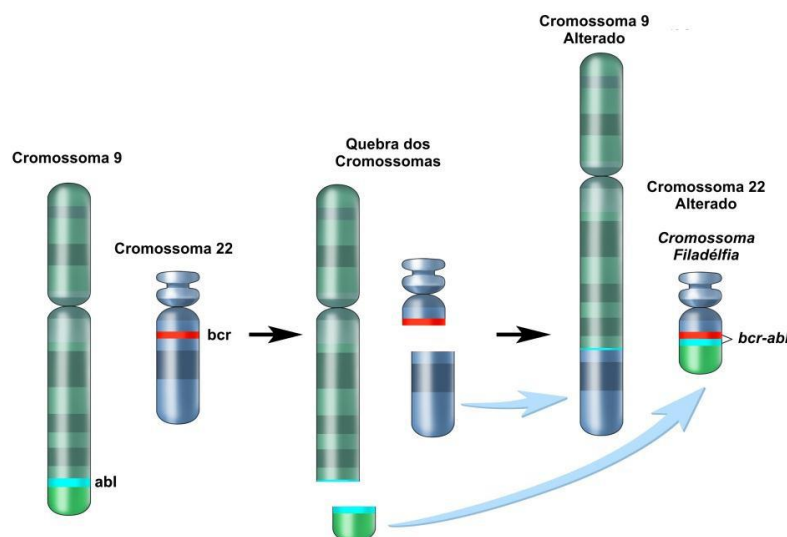
No que se refere às várias etnias e regiões geográficas não se encontra descrito nenhum fator predisponente para o desenvolvimento desta patologia.

### 1.1.1 O Cromossoma Filadélfia (Ph)

Em 1959, Peter Nowel e David Hungerford [11] identificaram um cromossoma mais pequeno que o normal, que denominaram de Cromossoma de Philadelphia, em doentes com LMC.

Doze anos depois, Janet D. Rowley demonstrou que este cromossoma era consequência de uma translocação recíproca entre o braço longo do cromossoma 9 e o braço longo do cromossoma 22 t(9;22) (q34;q11), [12, 13] resultando na justaposição da

sequência 3' do proto-oncogene *ABL* (Abelson) com a sequência 5' do gene *BCR* (Breakpoint Cluster Region) que origina o oncogene de fusão *BCR-ABL* (Figura 1). [14, 15]

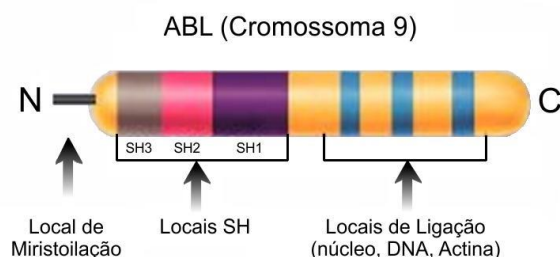


**Figura 1 - Formação do Cromossoma Filadélfia (Ph).** Da translocação recíproca entre o cromossoma 9 e o 22, resulta a justaposição entre o gene *BCR* (cr. 22) e o gene *ABL* (cr. 9), e a formação de um cromossoma 22 com dimensões reduzidas (adaptado de Cancer National Institute, 2010).

Atualmente, sabe-se que o cromossoma Ph está presente em cerca de 90% dos doentes com LMC e por isso, é considerado o marcador citogenético da doença. [5]

O gene *ABL*, Abelson Leukemia Gene, encontra-se no cromossoma 9 (9q34) e apresenta um tamanho de 225 Kb. [16] Este gene codifica a proteína ABL que apresenta atividade de tirosina cinase, sendo o seu peso molecular de 145 kDa.

Em termos estruturais, podemos distinguir diferentes domínios ao longo do gene importantes na transdução de sinais e na regulação do crescimento. [2] No terminal amínico (N) encontram-se domínios homólogos SRC (SH), que regulam a atividade de tirosina cinase e um local de miristoilação, que permite a associação da proteína codificada com outras proteínas da membrana. A zona central e o terminal carboxílico incorporam locais de ligação a diferentes estruturas, como o ADN e a actina (Figura 2).



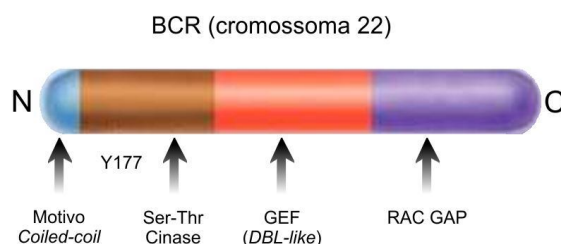
**Figura 2 - Domínios Funcionais do produto do Gene *ABL*.**

(N) corresponde ao terminal amínico, (SH) são domínios com homologia SRC e os restantes domínios correspondem a locais de ligação até ao terminal carboxílico (C) (adaptado Faderl *et al.*, 1999).

As alterações nos domínios SH3 e SH2 interferem com o potencial de transformação e malignidade da proteína, aumentando-o ou reduzindo-o. [1] A proteína apresenta duas isoformas que se distinguem pelo seu tamanho e localização: a isoforma A, que se encontra no citoplasma, é ligeiramente mais pequena, pois não apresenta o local de miristoilação, contrariamente à isoforma B, localizada no núcleo. [2, 17] A proteína ABL normal é expressa de forma ubíqua e encontra-se envolvida na regulação do ciclo celular, na resposta ao stresse genotóxico e na transmissão de informação com o microambiente celular. [1, 16]

A proteína BCR (*Breakpoint Cluster Region Protein*) possui 160 kDa de peso molecular e é expressa de forma ubíqua pelos tecidos, sendo codificada pelo gene *BCR* localizado no cromossoma 22 (22q11). [2] Estruturalmente, o gene *BCR* tem um tamanho total de 135 Kb e possui vários motivos funcionais. [16] No terminal amínico (N), encontra-se um domínio que permite a dimerização *in vivo* e outro que confere a atividade de cinase de serina-treonina. Os únicos substratos conhecidos para esta cinase são elementos da família das proteínas 14-3-3. A parte central do gene codifica um fator de troca de guanosinas, o GEF - *Guanine Nucleotide Exchange Factors*, cuja função é mediar a ativação da RHO, uma proteína envolvida na ativação de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B. O terminal carboxílico (C) codifica uma GTPase com atividade na proteína RAC, que por sua vez se encontra envolvida na regulação da polimerização da actina e da atividade da NADPH oxidase das células fagocíticas (Figura 3). [18]





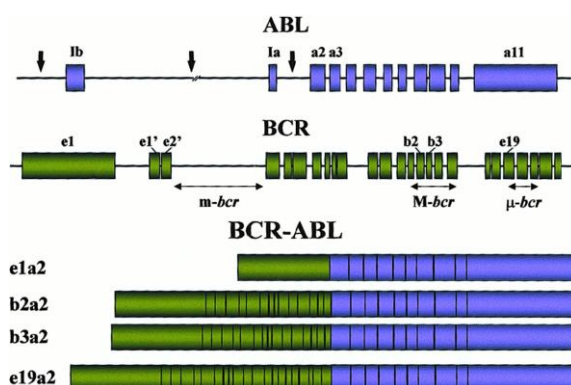
**Figura 3 - Domínios funcionais do produto do Gene *BCR*.**

(N) corresponde ao terminal amínico, onde se encontra o motivo que permite a dimerização. A seguir um domínio com atividade serina-treonina cinase. GEF - *Guanine nucleotide exchange factors*; GAP - *GTPase activating proteins*; (C) corresponde ao terminal carboxílico (adaptado Faderl *et al.*, 1999).

Da translocação entre o cromossoma 22 e o cromossoma 9 resulta a justaposição do gene *BCR* com o gene *ABL*, tendo como consequência o gene de fusão *BCR-ABL*. [10]

O gene *BCR* apresenta diferentes pontos de quebra o que pode originar diferentes transcritos de RNA mensageiro, de acordo com o local de inserção do gene *ABL*. Para o gene *ABL* também são conhecidos dois pontos de quebra, antes do exão 2 (a2) e depois deste (a3). Contudo, a translocação envolvendo o ponto de quebra a3 é bastante rara. [19]

Os pontos de quebra no gene *BCR* podem ocorrer em três regiões principais bem definidas: M-bcr (*major breakpoint cluster region*), m-bcr (*minor breakpoint cluster region*) e  $\mu$ -bcr (*micro breakpoint cluster region*) (Figura 4).



**Figura 4 - Localização dos pontos de quebra do gene *ABL* e *BCR*.**

Ponto de quebra na região M-bcr ocorre entre o exão 13 e 14 (b2a2 e/ou b3a2). Ponto de quebra na região minor-bcr (m-bcr) ocorre no exão 1 (e1a2). Ponto de quebra na região micro-bcr ( $\mu$ -bcr) ocorre entre o exão 19 e 20 (e19a2) (Adaptado de Deininger *et al.*, 2000)

O tipo de transcrito *BCR-ABL* é determinado pelo ponto de quebra no gene BCR.

O M-bcr é o ponto de quebra mais comum no gene BCR, localizado entre os exões 12 e 16 (também conhecidos b1 e b5). Quando a quebra ocorre na M-bcr, a sequência do transcrito *BCR-ABL* resultante pode ser b2a2 ou b3a2. Estes transcritos são traduzidos na proteína quimérica p210<sup>BCR-ABL</sup>, com peso molecular de 210kDa, a mais comum nos casos típicos de LMC. [20, 21, 16]

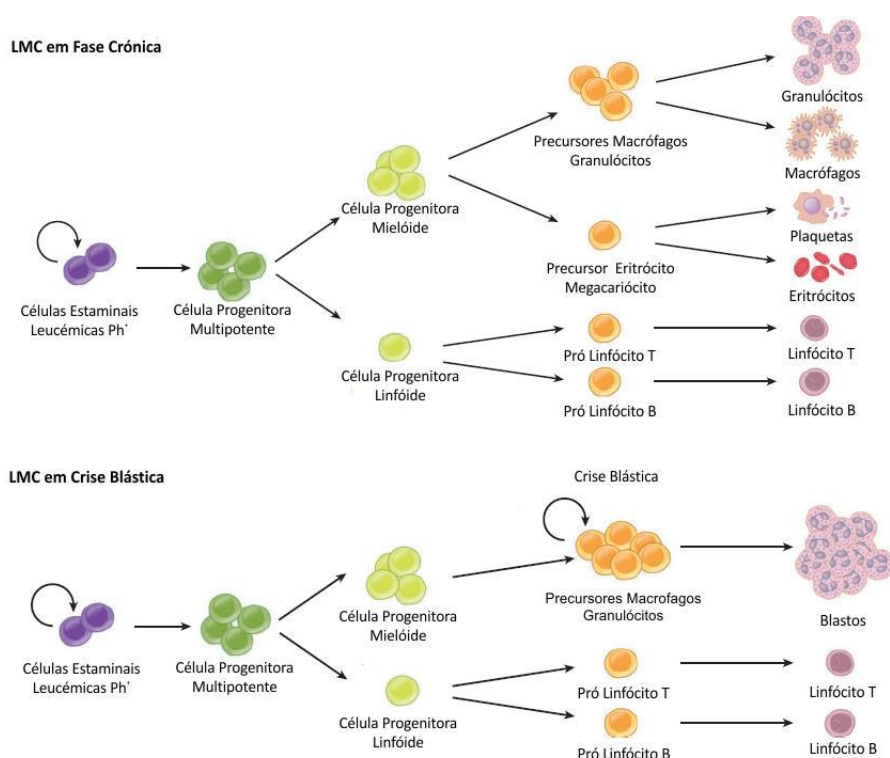
Quando o ponto de quebra ocorre na m-bcr, o transcrito *BCR-ABL* resultante é o e1a2, que é traduzido na proteína quimérica p190<sup>BCR-ABL</sup>, com peso molecular mais baixo (190kDa). Esta ocorre com maior frequência em Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA) Ph+. [1, 21]

Na  $\mu$ -bcr, o ponto de quebra ocorre nos exões 19 e 20, resultando a sequência do transcrito *BCR-ABL* e19a2, que é traduzida na proteína quimérica p230<sup>BCR-ABL</sup>, com peso molecular 230kDa, que normalmente está associada a casos de leucemia neutrofílica crônica. [1]

### 1.1.2 Diagnóstico e Manifestações Clínicas

A LMC apresenta três diferentes fases, ao longo do curso da doença: fase crônica, fase acelerada e crise blástica (Figura 5).

Geralmente, esta leucemia é diagnosticada durante a fase crônica. [22, 23]



**Figura 5 - Hematopoiese na Fase Crônica e na Crise Blástica da LMC.** As células estaminais cancerígenas (CEC) portadoras do gene *BCR-ABL* dão origem a um maior número de células progenitoras multipotentes (CPM) em ambas as fases da doença, em relação à hematopoiese normal. Durante a fase crônica, verifica-se um aumento de progenitores mielóides e, consequentemente, um aumento de células em vários estádios de maturação. Na crise blástica, os progenitores mielóides não se diferenciam acumulando-se na medula (mieloblastos) e podendo atingir a circulação sanguínea (adaptado de Lobo *et al.* 2007)

Os doentes apresentam leucocitose, tipicamente com basofília e sinais/sintomas de fadiga, sudorese noturna, astenia e perda ponderal, dor ou desconforto no quadrante superior esquerdo do abdômen e esplenomegalia. Raramente, apresentam dor óssea, hemorragias retinianas, priapismo, hepatomegalia, infiltração cutânea ou massa extramedular. [24]

É imposto, ao diagnóstico, realizar um hemograma com esfregaço de sangue periférico, aspirado de medula óssea, estudo citogenético com cariótipo por banda G e identificação dos transcritos de *BCR-ABL*, por técnicas de biologia molecular. [24]

No hemograma, encontra-se, normalmente, um desvio para a esquerda da linha mieloide, com a presença de mielócitos e metamielócitos imaturos, basófilos e eosinófilos.

No aspirado da medula óssea, verificam-se percentagens de blastos, promielócitos, mielócitos, eosinófilos e basófilos superiores ao normal. [24]

Os doentes não tratados na fase crónica progredirão, eventualmente, para a fase acelerada, em cerca de 3 a 5 anos. A presença de trissomia 8, isocromossoma 17 e de trissomia 19 estão associadas a um prognóstico adverso. [23]

As definições de fase acelerada e fase blástica de acordo com os critérios da *European Leukemia Net* (ELN) estão resumidas na Tabela 1. [23]

Tabela 1 - Definições de fase acelerada e crise blástica segundo a ELN [23]

Definições segundo a <i>European Leukemia Net</i> [23]	
Fase acelerada	Blastos no sangue ou medula óssea 15-29% ou blastos mais promielócitos no sangue ou medula >30%, com blastos <30%; Basófilos sanguíneos $\geq 20\%$ ; Trombocitopenia persistente ( $<100 \times 10^9$ células/L) não relacionada com a terapêutica; Anormalidades cromossómicas clonais nas células Ph+, sob tratamento
Crise blástica	Contagem de blastos no sangue periférico ou medula óssea $\geq 30\%$ ; Proliferação blástica extramedular, não esplénica

### 1.1.3 Tratamento da LMC

#### 1.1.3.1 Evolução do tratamento

Após a descrição inicial da LMC, há mais de 150 anos, houve um escasso progresso no seu tratamento por mais de um século. O busulfan e a terapia com radiação contribuíram para melhorar a qualidade de vida, mas não para prolongar a sobrevivência dos doentes.

A Hidroxiureia foi a primeira terapêutica que demonstrou aumentar a sobrevivência nos doentes com LMC. Seguiu-se o transplante alogénico de células hematopoiéticas e, mais tarde, numa minoria dos doentes, o tratamento com interferão- $\alpha$  recombinante que demonstrou uma sobrevivência global de 53% aos 10 anos, sendo que os doentes com uma resposta citogenética completa, apresentam uma sobrevida global de 70% aos 10 anos. [25]

O transplante alogénico de células hematopoiéticas é considerado, atualmente, o único tratamento curativo. No entanto, a morbilidade e mortalidade associadas ao procedimento são um problema importante. A sobrevivência global após transplante é variável, com uma média de 50% aos 5 anos em doentes em fase crónica. A mortalidade

relacionada com o transplante varia entre 8% e 20% e, em cerca de metade dos doentes ocorre doença enxerto contra hospedeiro.

Os doentes com score de Sokal mais baixo e na fase crónica, têm melhores *outcomes* com este tratamento. [23, 25]

O tratamento da LMC sofreu uma profunda evolução com a utilização de inibidores tirosina cinase. [23] Antes da introdução do imatinib, os regimes terapêuticos baseados no interferão- $\alpha$  eram o *gold standard* do tratamento da fase crónica da leucemia mieloide crónica.

O IRIS *trial* – *International Randomized Study of Interferon vs STI571* – que comparou o *outcome* de doentes com LMC tratados com interferão *versus* imatinib, demonstrou que, em 7 anos de *follow-up*, os doentes tratados com imatinib apresentavam maiores taxas de resposta citogenética, com manutenção da resposta hematológica e citogenética completa, baixa taxa de progressão para fase acelerada ou crise blástica e excelentes *outcomes* de sobrevivência – 86% aos 7 anos –, que excederam todas as taxas dos tratamentos anteriores da leucemia mieloide crónica. [26]

Além de verificar a segurança e eficácia do imatinib, o IRIS *trial* demonstrou a necessidade de uma definição quantitativa de resposta molecular, que emergiu com o aparecimento dos inibidores da tirosina cinase. Uma vez que a frequência de resposta citogenética completa é muito alta nos doentes tratados com imatinib (76% após 1 ano de tratamento), tornou-se premente a necessidade de avaliar os níveis de transcritos *BCR-ABL* por técnicas mais sensíveis para determinar a presença de doença residual mínima.

Cerca de 50% de todos os doentes demonstraram uma redução substancial dos transcritos, com uma resposta molecular com uma redução  $>3$  log da linha de base, resposta molecular *major*, que se relacionava positivamente com a sobrevivência livre de progressão [25] .

Atualmente, existem vários inibidores da tirosina cinase aprovados para o tratamento da LMC: os inibidores de primeira geração – imatinib, e os inibidores de segunda geração – nilotinib, dasatinib, bosutinib e ponatinib. Os primeiros três fármacos estão aprovados como terapêutica de primeira linha: imatinib, 400mg por dia; nilotinib, 300mg duas vezes por dia; e dasatinib, 100mg por dia. [23]

As *guidelines* mais recentes da *European Leukemia Net* (ELN) e da *National Cancer Comprehensive Network* (NCCN) não recomendam nenhum fármaco em particular como primeira linha terapêutica, desde que seja atingida uma resposta ótima ao tratamento. [23]

Os inibidores são considerados uma terapêutica crónica, que transformou uma doença maligna previamente incurável, numa doença tratável. No entanto, a adesão

---

deficiente a estes fármacos afeta negativamente o *outcome*. A adesão média varia entre 19% e 100% em vários artigos.

As causas mais comuns de não adesão intencional e não intencional são os efeitos adversos e o esquecimento da toma, respetivamente. [27]

Em 50% dos doentes com progressão da doença ou falência do tratamento são identificadas mutações pontuais no domínio cinase da *BCR-ABL* que conferem resistência aos inibidores tirosina cinase e, dependendo do local e tipo de mutação, é selecionada uma 2ª linha terapêutica.

A mutação *BCR-ABL* T315I confere resistência a todos os TKIs, com a exceção do ponatinib, inibidor tirosina cinase de 3ª geração. [23]

### 1.1.3.2 Resposta ao tratamento

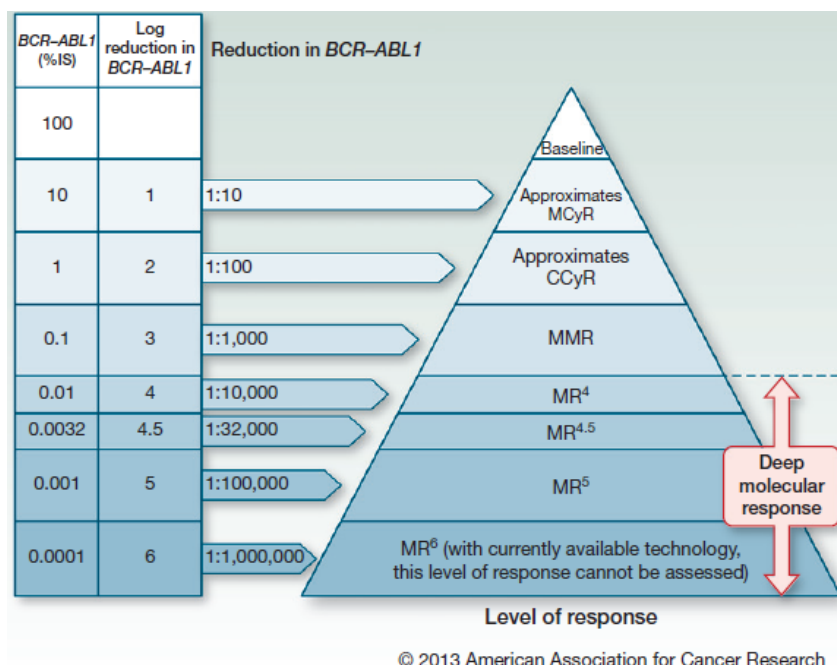
No presente, a eficácia dos tratamentos para a LMC é avaliada pela resposta hematológica, citogenética e molecular.

A **resposta hematológica**, considerado o primeiro nível de resposta terapêutica, define-se por uma normalização das contagens sanguíneas periféricas, com leucócitos  $<10 \times 10^9$  células/L e plaquetas  $<450 \times 10^9$  células/L, ausência de células imaturas como mielócitos, promielócitos ou blastos no sangue periférico, ausência de sinais e sintomas da doença, com desaparecimento da esplenomegalia. [22, 23]

A **resposta citogenética** é avaliada por cariótipo convencional em medula óssea. Pode ser dividida em: completa, com 0% metafases com Ph+; parcial, com 1 a 35% de metafases com Ph+; *major*, com 0 a 35% de metafases Ph+, englobando a resposta completa e parcial; ou *minor*, com  $>35\%$  de metafases Ph+. Quando se atinge a resposta citogenética completa, o número residual de células Ph+ só pode ser acedido por métodos moleculares quantitativos. [22, 23]

A **resposta molecular** é avaliada por PCR em Tempo Real quantitativo (qRT-PCR), através da determinação do rácio dos transcritos *BCR-ABL* e dos transcritos de *ABL* ou *GUS* (gene controlo). A resposta molecular *major* (RMM) é um nível de transcritos *BCR-ABL*  $<0,1\%$  na escala internacional (IS), que corresponde a uma redução de 3 log dos transcritos *BCR-ABL*. As respostas moleculares com uma redução  $>4$  log da linha de base são consideradas respostas moleculares profundas e na escala internacional correspondem a uma resposta molecular 4 (RM4.0), quando *BCR-ABL*  $<0,01\%$ , RM4.5 quando *BCR-ABL*  $<0,0032\%$  e RM5.0 quando *BCR-ABL*  $<0,001\%$  (Figura 6). [22, 23]

Para avaliação de respostas moleculares profundas, no caso de não serem detetados transcritos *BCR-ABL*, o gene controlo *ABL* deverá ser >32 000 cópias para estabelecer uma RM4.5 e >100 000 cópias para uma RM5.0. [22, 23]



**Figura 6 - International Scale - Níveis de resposta citogenética e molecular.**

MCyR: resposta citogenética *major*; CCyR: resposta citogenética completa; MR: resposta molecular. Mahon *et al.* (2014) [28]

### 1.1.4 Resposta Molecular Profunda

A avaliação de resposta molecular por RQ-PCR em doentes sob tratamento com inibidores da tirosina cinase tem um papel importante no prognóstico em doentes com LMC. [23]

O progresso da biologia molecular tornou possível ultrapassar a resposta citogenética completa, permitindo a deteção de doença residual.

Atualmente, as recomendações para a monitorização envolvem a resposta hematológica, citogenética e molecular. A ELN e a NCCN recomendam a avaliação das respostas citogenética e molecular aos 3, 6 e 12 meses; avaliando a resposta molecular a cada 3 meses, até que seja atingida uma resposta molecular *major*. [28]



#### 1.1.4.1 Relevância clínica da resposta molecular profunda

Vários estudos demonstraram que os doentes com resposta molecular profunda têm menor probabilidade de perder a resposta molecular e melhores *outcomes* clínicos a longo prazo, como a sobrevivência global, livre de eventos e livre de progressão. [28]

No estudo de Hughes *et al.* (2010), os doentes que atingiram resposta molecular *major* nos primeiros 18 meses de tratamento, tiveram remissões mais duradouras, livre de progressão para fase acelerada ou crise blástica (99% nos doentes com RMM *versus* 90% nos doentes sem RMM), com uma sobrevivência livre de eventos de 95% aos 7 anos de *follow-up*.

As categorias de resposta molecular aos 3, 6 e 12 meses estavam associadas à sobrevivência livre de eventos, sendo que a obtenção mais rápida de resposta molecular *major* associa-se a um melhor *outcome* a longo prazo. [26]

Recentemente, ensaios clínicos, como o de Etienne *et al.* (2013), têm vindo a corroborar a superioridade da resposta molecular completa na avaliação do prognóstico, independentemente da resposta molecular *major*, propondo que esta seja o principal objetivo do tratamento da LMC. A sobrevivência livre de eventos aos 5 anos de doentes que atingiram apenas resposta citogenética, RMM ou RMC foram, respetivamente, 27,7%, 79,9% e 98,4%. Cerca de 24% dos doentes atingiram RMC num intervalo de tempo médio de 32,7 meses. [29]

Estes estudos, com doentes tratados com imatinib, fornecem evidências encorajadoras para a obtenção de respostas moleculares profundas como um importante objetivo clínico. Consequentemente, coloca-se a questão se estas respostas moleculares profundas são preditivas de *outcomes* mais favoráveis no tratamento com inibidores de segunda geração, também.

Nos últimos resultados do estudo *Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials – Newly Diagnosed Patients* (ENESTnd) a ausência de resposta molecular precoce estava associada a menor taxa de obtenção de resposta molecular profunda, maior risco de progressão e menor sobrevida global. [30]

No estudo de Marin *et al.* (2012), foram analisados 142 doentes com LMC tratados com dasatinib, como terapêutica de primeira linha, com o objetivo de identificar os doentes que responderão pior a este tratamento. Os autores concluíram que o nível de transcritos aos 3 meses (*BCR-ABL* < 10%) após o início do tratamento é preditivo do *outcome*,



permitindo identificar cerca de 10% dos doentes tratados que têm menor probabilidade de obter resposta citogenética completa e respostas moleculares profundas. [31]

Deste modo, tem-se demonstrado que, apesar da resposta citogenética completa ser um importante marco clínico no prognóstico dos doentes com LMC tratados com inibidores da tirosina cinase, a resposta molecular profunda tem um valor preditivo superior e correlaciona-se melhor com o *outcome*.

Quando atingida precocemente, a resposta molecular com *BCR-ABL*<10%, o *outcome* é mais favorável, com maior sobrevida global e livre de progressão.

#### 1.1.4.1.1 Fatores que influenciam a obtenção de resposta molecular profunda Terapêutica

Uma vez demonstrada a importância clínica e o valor preditivo de atingir valores de transcritos *BCR-ABL*<10% aos 3 meses de tratamento com inibidores da tirosina cinase de primeira e segunda gerações, iniciou-se uma busca para identificar os doentes com maior ou menor probabilidade de obter uma resposta molecular profunda.

O **atingimento precoce** de uma resposta citogenética completa e de resposta molecular *major* são fatores que predizem, de forma consistente em vários estudos, a obtenção de resposta molecular completa. No entanto, existem outros fatores que têm vindo a ser associados a este *outcome*, como o sexo, o *score* de Sokal, a adesão ao tratamento e a intensidade da dose.

No estudo de Branford *et al.* (2013), os fatores que demonstraram associação estatisticamente significativa com a RMC estável (por mais de 24 meses), foram o sexo do doente e o valor de *BCR-ABL* aos 3 meses de tratamento com imatinib.

Indivíduos do **sexo feminino** e com ***BCR-ABL*<10% aos 3 meses**, tiveram uma incidência superior de RMC estável. Por outro lado, os doentes que apresentavam resposta molecular *major* antes dos 18 meses tiveram maior incidência de RMC estável. Estes doentes com *BCR-ABL* indetetável, durante 24 meses são elegíveis para a descontinuação do tratamento com imatinib. [32]

No ensaio clínico de Etienne *et al.* (2013), os fatores com associação estatisticamente significativa com o atingimento de RMC foram a ausência de esplenomegalia, o atingimento de resposta citogenética completa nos primeiros 12 meses e o atingimento de RMM nos 12 meses subsequentes ao atingimento da resposta citogenética. [29]

No estudo ENESTnd, verificou-se que um alto **score de Sokal** estava associado a falência da obtenção de resposta molecular precoce no grupo tratado com imatinib, mas não no grupo tratado com nilotinib. Neste último grupo, a interrupção do tratamento e a diminuição da dose foram os fatores associados à falência. [30]

#### 1.1.4.2 Alteração precoce de tratamento

A resposta aos TKIs é o fator de prognóstico mais importante. Com base nos vários estudos publicados, demonstrando uma superioridade prognóstica de uma resposta molecular mais profunda e mais precoce, surgiram nos últimos anos, novas recomendações para a abordagem da LMC, da ELN e da NCCN, visando a obtenção mais rápida da resposta molecular, com vista a suspensão da terapêutica. [22, 23]

Segundo a ELN e a NCCN, a alteração precoce de tratamento, deve ser realizada quando não se atinge uma resposta ótima com o tratamento com TKI de primeira linha, de modo a obter uma resposta molecular mais profunda e mais precoce. Tal, exige monitorizações frequentes da resposta ao tratamento, com o objetivo de identificar precocemente uma resposta subótima. [22, 23]

Segundo a *European Leukemia Net* – Tabela 2 –, é considerada uma resposta ótima ao tratamento com TKI de primeira linha quando: aos 3 meses obtém-se *BCR-ABL* ≤ 10% e/ou Ph+ ≤ 35%; aos 6 meses *BCR-ABL* ≤ 1% e/ou Ph+ 0%; aos 12 meses, *BCR-ABL* ≤ 0,1%.

É considerada falência terapêutica quando: aos 3 meses não se obtém resposta hematológica completa e/ou Ph+ > 95%; aos 6 meses, *BCR-ABL* > 1% e/ou Ph+ > 35%; aos 12 meses, *BCR-ABL* > 1% e/ou Ph+ > 0; ou perda da resposta hematológica completa, citogenética ou molecular, obtidas em qualquer altura. Os valores intermédios consideram-se uma zona de aviso, que requer monitorização mais frequente do doente. [23]

Tabela 2 - Resposta ao tratamento segundo a ELN [23]

	Ótima	Aviso	Falência
<b>Diagnóstico</b>	Não aplicável	Alto risco ou anormalidades cromossômicas clonais <i>major Ph+</i>	Não aplicável
<b>3 meses</b>	BCR-ABL≤10% e/ou Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL>10% e/ou Ph+ 36-95%	Sem resposta hematológica completa e/ou Ph+>95%
<b>6 meses</b>	BCR-ABL≤1% e/ou Ph+ 0%	BCR-ABL1-10% e/ou Ph+ 1-35%	BCR-ABL>1% e/ou Ph+>35%
<b>12 meses</b>	BCR-ABL≤0,1%	BCR-ABL>0,1-1%	BCR-ABL>1% e/ou Ph+>0
<b>&gt;12 meses ou em qualquer altura</b>	BCR-ABL≤0,1%	Anormalidades cromossômicas clonais com Ph- (deleção do cromossoma 7)	Perda da resposta hematológica completa, citogenética ou molecular, obtidas em qualquer altura

Embora o imatinib seja uma opção terapêutica efetiva para muitos doentes, é reconhecido que alguns necessitam de inibidores mais potentes. O tratamento com a alteração precoce é uma abordagem terapêutica efetiva, com maiores taxas de resposta molecular profunda e menor toxicidade dos inibidores de segunda geração. [22, 23, 33]

#### 1.1.4.3 Resposta molecular completa e remissão livre de tratamento

É provável que a razão mais preponderante para procurar obter uma resposta molecular completa seja a probabilidade de conseguir uma remissão livre de tratamento. É controverso, se o facto de os transcritos de *BCR-ABL* serem indetetáveis, possa ser considerado uma cura. [24]

Este conceito inspirou vários ensaios clínicos acerca da suspensão do imatinib em doentes na fase crónica da leucemia mieloide crónica, que apresentavam uma resposta molecular completa de longa duração. Foi reconhecido que alguns doentes com LMC, com remissão molecular completa, podem mantê-la após a suspensão do imatinib.

No estudo piloto de Rousselot *et al.* (2007), com um follow-up médio de 18 meses, verificou-se que 50% dos doentes sofreram perda de resposta após a cessação do tratamento com imatinib e que esta ocorreu nos primeiros 6 meses de descontinuação, com resposta favorável à reintrodução da terapêutica com o inibidor. Aos 18 meses de follow-up, 50% dos doentes mantiveram a remissão molecular. [40]

No primeiro grande estudo prospectivo não randomizado, Mahon *et al.* (2010),- French STIM study – que avaliou 100 doentes, com um follow-up médio de 17 meses, verificou-se que 39% dos indivíduos com RMC há mais de 2 anos, mantiveram-na após descontinuação do imatinib. Dos 42 doentes que recidivaram, 26 recuperaram a RMC e 16 mostraram diminuição dos níveis de *BCR-ABL* após reintrodução do TKI. [41]

No estudo coreano, conduzido por Goh *et al.* (2011), com um follow-up médio de 7 meses, 90% dos doentes mantiveram a RMC, sendo que 10% mantiveram apenas uma RMM. [42]

Matsuki *et al.* (2011), no seu estudo prospectivo – Keio STIM study – avaliaram a manutenção da RMC após cessação do imatinib em 40 doentes em RMC há 2 anos, e os fatores a esta associados. Houve perda de RMC em aproximadamente 45% dos doentes, os quais mantiveram sensibilidade ao retratamento com TKIs. [43]

Incentivados pelos estudos realizados acerca da descontinuação do imatinib, Rea *et al.* (2011), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a possibilidade de cessação do tratamento com TKIs de segunda geração (nilotinib e dasatinib) em doentes com doença residual mínima indetetável. Verificou-se que 31,25% dos doentes perderam a RMC, nos primeiros 4 meses de follow-up, que recuperaram rapidamente após reintrodução dos inibidores de segunda geração. [44]

No estudo de Takahashi *et al.* (2012), 56% dos doentes manteve a RMC e a recorrência molecular ocorreu em 44%, não tendo associada recorrência citogenética. À semelhança dos estudos supracitados, todos os doentes recuperaram a RM completa ou *major*, após reiniciação do TKI. [45]

Um ensaio clínico prospectivo, conduzido por Ross *et al.* (2013), demonstrou que cerca de 47,1% dos doentes com doença residual indetetável, tratados com imatinib, podem parar o tratamento, sem perda da resposta molecular. Foi, também, verificado, que doentes com remissão livre de tratamento podem ter DNA *BCR-ABL* detetável, vários anos após a suspensão do TKI. A maioria das recidivas ocorreu nos primeiros 4 meses após descontinuação, não ocorrendo recidivas após os 27 meses. Todos os pacientes com recorrência molecular da doença, mantiveram-se sensíveis ao tratamento com imatinib. [46]

Todos estes estudos sugerem que a descontinuação dos inibidores da tirosina quinase é possível em cerca de 40% dos doentes que apresentem resposta molecular completa há pelo menos dois anos. A maioria das recidivas ocorrem nos primeiro 6 meses após a descontinuação, sendo que a maior parte dos indivíduos mantém-se sensível ao

tratamento com imatinib, conseguindo recuperar a resposta molecular e atingir novamente a RMC.

Assim, os resultados sugerem que a suspensão do imatinib pode ser segura em doentes com resposta molecular profunda sustentada. No entanto, a definição de recidiva molecular foi diferente nos vários estudos, assim como o critério para reiniciar o tratamento, sendo necessária uma definição uniformizada.

Dada a natureza preliminar destes dados a ELN e a NCCN continuam a considerar os TKIs como uma terapêutica de duração indefinida, sendo que a suspensão é apenas permitida em ensaios clínicos. [22, 23]

#### 1.1.4.3.1 Fatores modificadores da duração da remissão livre de tratamento

As taxas e a rapidez da recidiva observada nos doentes que cessam a terapêutica com TKIs, sugere que o principal fator influenciador é o nível de doença residual na altura da descontinuação. A taxa de redução dos transcritos *BCR-ABL* declina com o tempo, pelo que doentes com resposta molecular profunda com maior duração, terão doença molecularmente inferior. [28]

Outros fatores que parecem estar associados a uma maior probabilidade de remissão livre de tratamento são a duração do tratamento com imatinib, o baixo score de Sokal, a duração da resposta molecular completa e o tratamento prévio com interferão- $\alpha$ . No entanto, os estudos não são consistentes.

No Keio STIM study, não houve nenhum fator com associação significativa à manutenção da RMC, nomeadamente, o tratamento prévio com interferão- $\alpha$ , a duração do tratamento com imatinib e a duração da RMC. [43]

No French STIM study, os únicos fatores relacionados com um baixo risco de recidiva foram o score de Sokal baixo e intermédio e uma duração do tratamento com imatinib superior a 5 anos. [41]

Takahashi *et al.* (2012), conduziram um estudo retrospectivo a nível nacional, no Japão, identificando e avaliando os indivíduos que tinham cessado a terapêutica com imatinib há mais de 6 meses, com o objetivo de caracterizar o *outcome* e o perfil dos doentes em fase crónica da LMC, que podem descontinuar o imatinib. As características estatisticamente significativas, relacionadas com a recidiva aos 12 meses após descontinuação do imatinib, foram a dose e a duração do tratamento com imatinib; o



tratamento prévio com interferão- $\alpha$  e a duração da resposta molecular completa antes da descontinuação. [45]

No estudo de Ross *et al.* (2013), a curta duração do tratamento prévio com interferão- $\alpha$  foi significativamente associada a um maior risco de recorrência da doença e a um atingimento mais lento da doença residual mínima indetetável. [46]

Em suma, a resposta molecular é heterogênea, e diferentes doentes podem ter diferentes níveis de doença residual, apesar de terem doença indetetável. A maioria dos doentes com resposta molecular completa, após descontinuação do imatinib, têm níveis de transcritos *BCR-ABL* positivos. No entanto, esta persistência não significa necessariamente recidiva. [28]



## 2. Objetivos

Este estudo tem como principal objetivo pesquisar e analisar comparativamente, num grupo de doentes com Leucemia Mielóide Crónica, os resultados obtidos na quantificação de transcritos *BCR-ABL* nas populações de neutrófilos e células CD34+ com os resultados obtidos em amostras de sangue total. Por seguinte, pretende-se determinar os benefícios da quantificação de *BCR-ABL* em populações celulares e a sua relação com a resposta à terapêutica com imatinib.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Caracterização da população em estudo

Foram estudados 15 doentes com LMC sob terapêutica com imatinib, 6 do sexo feminino e 9 do sexo masculino. A média de idade ao diagnóstico foi de 56 anos (42-85 anos).

Na tabela 3, encontra-se a informação da população estudada, relativamente ao género, idade de diagnóstico e respetivos dados clínicos.

**Tabela 3 - Identificação e características clínicas população em estudo.**

ID	Género	Idade Diagnóstico	Hemoglobina (g/dL) (13-17,5 g/dL)	Leucócitos ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) (4-10 $\times 10^6/\text{mL}$ )	Neutrófilos ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) (2-7 $\times 10^6/\text{mL}$ )	Transcrito <i>BCR-ABL</i>
1	Feminino	54	13,4	8,61	52,5/4,52	e13a2
2	Masculino	60	13,5	2,63	57,2/1,5	e13a2
3	Feminino	51	11,6	5,03	58,6/2,95	e14a2
4	Masculino	52	13,2	4,92	57,4/2,82	e13a2
5	Feminino	42	11,2	7,09	49,1/3,48	e14a2
6	Masculino	44	14,5	5,58	49,0/2,73	e13a2
7	Feminino	85	13	5,6	57/3,19	e14a2
8	Masculino	73	12,1	6,33	45,0/2,85	e14a2
9	Masculino	55	12,6	5,23	47,2/2,47	e13a2
10	Masculino	73	12,6	5,93	43,6/2,59	e13a2
11	Feminino	47	10,4	3,67	53,7/1,97	e13a2
12	Feminino	57	13,1	9,73	51,6/5,02	e13a2
13	Masculino	52	14,8	6,27	70/4,39	e14a2
14	Masculino	51	15,1	7,49	58,3/4,37	e14a2
15	Masculino	46	14,6	7,77	62,1/4,83	e14a2



## 3.2 Identificação e Quantificação dos transcritos *BCR-ABL*

### 3.2.1 Preparação das Amostras

A pesquisa e quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL* foi efetuada em RNA extraído de sangue periférico em EDTA. Para cada doente, procedeu-se à extração de RNA de amostras obtidas de sangue total e de células isoladas pela metodologia de *cell-sorting*, neutrófilos e células CD34+.

#### *Preparação de amostras de sangue total*

Cerca de 12 mL de sangue periférico, em EDTA, foram centrifugados 2700 rpm/10 min e removido o *buffy coat* para tubo cônico devidamente identificado. Após lise dos eritrócitos, com tampão de lise *Red Blood Cell Lysis Buffer* 1x e centrifugação 3000 rpm/5 min desprezou-se o sobrenadante. Ao *pellet* de glóbulos brancos, adicionou-se 5 mL de tampão PBS seguida de centrifugação 3000 rpm/5 min. Decantou-se o sobrenadante.

Ao *pellet* adicionou-se 0,75 mL de *TRIzol® Reagent* (Ambion, Life Technologies) por  $1,5 \times 10^7$  células, de acordo com o protocolo. As amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em tubos de *Eppendorf*, devidamente identificados, de 1,5 mL.

#### *Separação celular por cell-sorting*

Após centrifugação de 6 mL de sangue periférico, em EDTA, retirou-se o *buffy-coat* e procedeu-se à lise com dos eritrócitos com cloreto de amônio durante 20 minutos e com o tubo deitado. Após centrifugação retirou-se o sobrenadante.

Para a separação celular, por *cell sorting*, foram adicionados os anticorpos monoclonais CD45-PO (Becton Dickinson, USA), CD16-PB (Becton Dickinson, USA) e CD34-PerCP-Cy5.5 (Becton Dickinson, USA) e incubou-se durante 15 minutos, no escuro. Após adição de Tampão fosfato-salino (PBS), centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante por decantação. As amostras foram ressuspensas com PBS e adquiridas no cell sorter **FACSAria III** (Becton Dickinson, USA) para a separação celular.

Após a separação celular, para tubos com PBS, centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante. Por sub-população celular foram adicionados cerca de 300 µl de *TRIzol® Reagent* (Ambion, Life Technologies) e armazenou-se a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Extração de RNA Total

A extração de RNA a partir de Trizol foi efetuada de acordo com as recomendações do fabricante (Ambion, Life Technologies) e consiste em 4 etapas: separação de fases, precipitação do RNA, lavagem do RNA e ressuspensão do RNA.

#### *Separação de Fases*

Retirar as amostras do congelador e deixar à temperatura ambiente durante 10 min. Homogeneizar.

Adicionar 0,2 mL de clorofórmio por 1 mL de Trizol, tapar o tubo e homogeneizar vigorosamente.

Incubar durante 15 min.

Centrifugar a amostra a 12.000 rpm/10 min.

Após a centrifugação, a mistura ficará separada em 3 partes: no fundo do tubo uma fase avermelhada (fenol + clorofórmio), uma interfase, e uma fase aquosa superior (onde está contido o RNA). A fase aquosa consiste em aproximadamente 50% do volume total.

#### *Precipitação do RNA*

Transferir a fase aquosa para um novo tubo.

Precipitar o RNA da amostra adicionando isopropanol. Usar 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de Trizol utilizado. Homogeneizar.

Incubar as amostras a -20°C durante 20 minutos.

Centrifugar a 10.600 rpm/10min.

O RNA precipitado irá formar um *pellet* em forma de gel no fundo e nas paredes do tubo.

#### *Lavagem do RNA*

Remover o sobrenadante, por decantação.

Lavar o *pellet*, adicionando 1 mL de etanol 75% por 1 mL de Trizol utilizado.

Misturar a amostra, com o vortex, e centrifugar a 8400 rpm/5min.

Retirar o etanol, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*.

Deixar secar, durante 5-10 min. É importante não deixar o *pellet* secar completamente, pois irá diminuir sua solubilidade.

### *Ressuspender o RNA*

Dissolver o RNA em água RNase-free, homogeneizando com a pipeta algumas vezes.

### 3.2.3 Quantificação RNA

O RNA foi quantificado por espectrofotometria no *NanoDrop1000* (Thermo Scientific).

### 3.2.4 RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction)

Para cada amostra foram transcritos 2 ng de RNA utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Termo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. Nas amostras em com baixa concentração de RNA foi transcrita a totalidade de RNA.

### 3.2.5 PCR- Multiplex para identificação de transcritos BCR-ABL

A pesquisa dos transcritos do gene de fusão BCR-ABL1 foi efetuada em cDNA pela metodologia de PCR-Multiplex, que permite amplificar numa única reação os 3 tipos de transcritos *BCR-ABL* mais comuns e uma banda controlo da reação. Utilizaram-se os seguintes *primers* indicados na tabela 4.

Tabela 4 - Primers utilizados para pesquisa dos transcritos BCR-ABL.

<b>Primer BCR-C</b>	5' – ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG – 3'
<b>Primer B2B</b>	5' – ACAGAATTCGCTGACCATCAATAAG – 3'
<b>Primer C5e</b>	5' – ATAGGATCCTTTGCAACCGGTCTGAA – 3'
<b>Primer CA3</b>	5' – TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG – 3'

Como controlo positivo para os transcritos e13a2, e14a2 e e1a2 foram utilizadas as linhas celulares BV173, K562 e SD1, respetivamente.

A reação de PCR foi efetuada utilizando o *Multiplex PCR Kit* (Qiagen) (Tabela 5) no termociclador T Professional Biometra com as seguintes condições: ativação inicial de 95°C, 15 min seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C, 30seg), *annealing* (59°C, 1min30seg) e extensão (72°C, 1 min) e uma extensão final a 72°C, 10 min.

**Tabela 5 - Mistura PCR Multiplex para transcritos BCR-ABL.**

Reagentes	Volume (μL)
ddH <sub>2</sub> O	4,9
Master-Mix	11,0
Q Solution	2,5
Primer BCR-C (10μM)	0,4
Primer B2B (10μM)	0,4
Primer C5e (10μM)	0,4
Primer CA3 (10μM)	0,4
Volume Final	20μL
cDNA	2μL

### 3.2.6 PCR-Simples para identificação dos transcritos e13a2 e e14a2

Nas amostras de cDNA de neutrófilos e células CD34+ a identificação de transcritos foi efetuada por PCR-Simples utilizando o protocolo BIOMED-1 [35], cujos *primers* estão indicados na tabela 6.

**Tabela 6 - Primers utilizados para pesquisa dos transcritos BCR-ABL.**

<b>Primer BCR-b1-A</b>	5' – GAAGTGTTCAGAAGCTTCTCC – 3'
<b>Primer ABL-a3-B</b>	5' – GTTTGGGCTTCACACCATTCC – 3'

#### 3.2.6.1 Electroforese em gel de agarose

A visualização dos produtos de PCR foi efetuada por electroforese em gel de agarose 2% (*Ultrapure™ agarose, Invitrogen*) corado com *Sybr® Safe DNA (Molecular Probes, Invitrogen)*. Os fragmentos de amplificação foram visualizados e fotografados através de um transiluminador de UV (*Kodac EDAS 290; Vilber Lourmat – UV*).

### 3.2.7 PCR em Tempo Real Quantitativo (RQ-PCR)

A quantificação dos transcritos do gene *BCR-ABL* (p210) foi efetuada por RQ-PCR de acordo com os procedimentos da *Europe Against Cancer* (EAC) [34], utilizando como gene controle o *ABL*. A sequência dos *primers* e das sondas para o *BCR-ABL* e *ABL* utilizados encontram-se nas tabelas 7 e 8, respetivamente.

Tabela 7 - Primers e sonda utilizados para transcritos *BCR-ABL1* Major “e13a2” e “e14a2”.

<b>Primer ENF501</b>	5' – TCCGCTGACCATCAAYAAGGA – 3'
<b>Primer ENR561</b>	5' – CACTCAGACCCTGAGGCTCAA – 3'
<b>Sonda ENPr541</b>	Fam – CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA – Tamra

Tabela 8 - Primers e sonda para gene controle *ABL1*.

<b>Primer ENF1003</b>	5' – TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT – 3'
<b>Primer ENR1063</b>	5' – GATGTAGTTGCTTGGGACCCA – 3'
<b>Sonda ENP1043</b>	Fam – CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT – Tamra

Para cada amostra, foram efetuadas reações em triplicado para o *BCR-ABL* e em duplicado para o *ABL* (Tabela 9 e 10). Foram utilizados plasmídeos calibradores Ipsogen (*Qiagen*) para determinação do número de cópias do *BCR-ABL* e *ABL*.

Tabela 9 - Mistura para transcritos Major *BCR-ABL 1* (p210).

Major <i>BCR-ABL1</i> p210	C inicial (μM)	C final (μM)	Volume (μL)
ENF 501	50	0,3	0,15
ENR 561	50	0,3	0,15
ENPr 541	100	0,2	0,05
ddH <sub>2</sub> O			7,15
TaqMan Universal PCR			
Master Mix (Applied Biosystems)	x2	x1	12,5
Volume Final			20μL
cDNA			5μL

Tabela 10 - Mistura para gene controle ABL1.

Gene Controle ABL1	C inicial ( $\mu\text{M}$ )	C final ( $\mu\text{M}$ )	Vol/Poço ( $\mu\text{L}$ )
ENF 1003	10	0,3	0,75
ENR 1063	10	0,3	0,75
ENPr 1043	10	0,2	0,5
ddH <sub>2</sub> O			5,5
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	x2	x1	12,5
Volume Final			20 $\mu\text{L}$
cDNA			5 $\mu\text{L}$

A reação de PCR foi efetuada no termociclador *Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System* com uma ativação enzimática a 50°C, 2 minutos, desnaturação a 95°C, 10 minutos, seguida de 50 ciclos de desnaturação a 95°C, 15 segundos e *annealing*/extensão a 60°C, 1 minuto.

### 3.3 Análise estatística

Para a análise estatística foi usado o software *GraphPad Prism* versão 6.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Foi utilizado o coeficiente de correlação de *Pearson*, com intervalo de confiança de 95%, que mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas, para a análise das variáveis N° Cópias Gene *BCR-ABL* e % *BCR-ABL/ABL* das diferentes populações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando p-value <0,05.

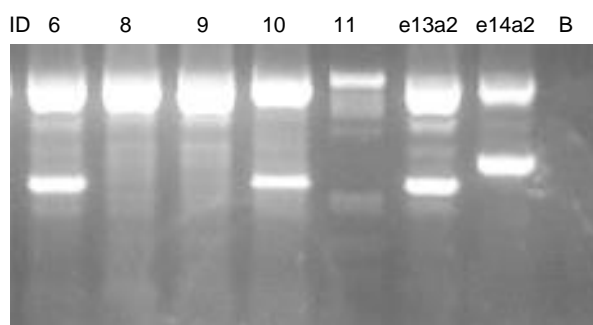
## 4. Resultados

A extração de RNA das amostras separadas por *cell-sorting* foi efetuada a partir de um número médio de neutrófilos de 981376 (602468 - 1089352) e de um número médio de células CD34+ de 10295 (1707-24444).

Nas amostras de sangue total foram transcritos 2 µg de RNA, enquanto que nas amostras de neutrófilos e CD34+ foram transcritos, em média, 0.05 µg (0.03 - 0.1 µg).

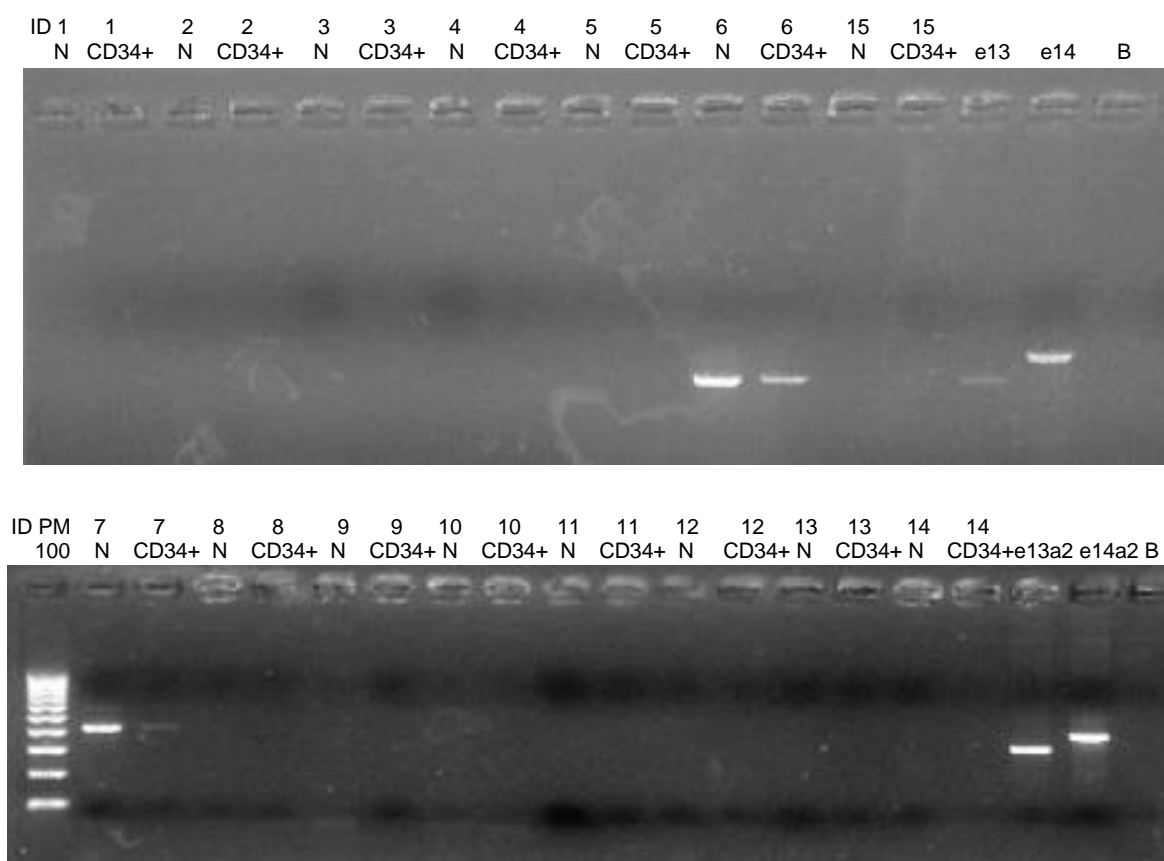
### 4.1 Pesquisa do transcrito *BCR-ABL*

Nas amostras de cDNA de sangue total, a pesquisa do transcrito *BCR-ABL* foi efetuada por PCR-Multiplex (Figura 7). Foi possível detetar transcritos em 6 amostras: ID 6, 7, 10, 12, 13, 14 (Tabela 11).



**Figura 7 - Electroforese em gel de agarose 2% dos produtos do PCR-Multiplex.** Podemos observar a presença do transcrito e13a2 nas amostras de sangue total 6 e 10.

Nas amostras de cDNA de neutrófilos e CD34+, a pesquisa do transcrito *BCR-ABL* foi efetuada por PCR Simples (Figura 8). Apenas 2 amostras apresentavam transcritos detetáveis por PCR-Simples: ID 6 e 7, nos neutrófilos e nas células CD34+ (Tabela 11).



**Figura 8 - Electroforese em gel de agarose 2% dos produtos do PCR-Simples.** Podemos observar a presença do transcrito e13a2 nas amostras de sorter 6 e a presença do transcrito e14a2 nas amostras de sorter 7.



Tabela 11 - Detecção dos transcritos e13a2 e e14a2 nas diferentes populações celulares.

ID	SANGUE TOTAL		NEUTRÓFILOS		CD34+	
	e13a2	e14a2	e13a2	e14a2	e13a2	e14a2
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	+	ND	+	ND	+	ND
7	ND	+	ND	+	ND	+
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	+	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	+	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	+	ND	ND	ND	ND
14	ND	+	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND

## 4.2 Quantificação do transcrito *BCR-ABL*

Para cada doente foi efetuada a quantificação do número de cópias dos transcritos *BCR-ABL* e *ABL* por RQ-PCR nas amostras de sangue total, neutrófilos e CD34+ (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados obtidos pela quantificação do transcrito *BCR-ABL*. Através da análise do tempo tratamento e %BCR-ABL/ABL do sangue total, obtemos a resposta molecular.

ID	Tempo tratamento (Meses)	SANGUE TOTAL				NEUTRÓFILOS			CD34+		
		Nº Cópias Gene ABL	Nº Cópias Gene BCR-ABL	% BCR-ABL/ABL	Resposta Molecular (IS) *	Nº Cópias Gene ABL	Nº Cópias Gene BCR-ABL	% BCR-ABL/ABL	Nº Cópias Gene ABL	Nº Cópias Gene BCR-ABL	% BCR-ABL/ABL
1	141	116952	2	0,00171	5.0	349	56	16,05	65	14	21,54
2	45	20273	4	0,019731	4.0	215	27	12,56	33	15	45,45
3	129	137585	1	0,000727	5.0	210	38	18,10	31	34	109,68
4	154	44017	1	0,002272	5.0	152	2	1,32	60	ND	ND
5	30	119538	ND	ND	5.0	281	ND	ND	50	ND	ND
6	6	153492	27143	17,68366	Sub-ótima	1805	2234	123,77	780	486	62,31
7	3	134137	10613	7,91206	Ótima	914	641	70,13	65	36	55,38
8	21	72511	2	0,002758	5.0	444	6	1,35	178	1	0,56
9	17	51705	4	0,007736	4.5	130	ND	ND	2	ND	ND
10	12	49789	808	1,622848	Sub-ótima	240	1	0,42	33	ND	ND
11	166	104156	1	0,00096	5.0	121	ND	ND	20	ND	ND
12	39	86256	300	0,347802	3.0	6	ND	ND	160	1	0,54
13	3	69787	985	1,411438	Ótima	72	34	47,81	5	ND	ND
14	52	123698	116	0,093777	3.0	333	ND	ND	86	3	3,44
15	38	88679	7	0,007894	4.5	147	ND	ND	5	ND	ND

\* A avaliação de resposta molecular foi efetuada pela escala internacional (IS) tendo em conta o fator de conversão do laboratório.

Em sangue total, a média de número de cópias de *ABL* foi 91505 (20273-153492). Nas amostras separadas por *cell-sorting*, a média de número de cópias de *ABL* foi de 361 (6-1805) para os neutrófilos e de 105 (2-780) para as CD34+, valores bastante inferiores aos obtidos no sangue total. No entanto, observou-se uma ligeira correlação positiva entre o número de cópias de *ABL* no sangue total e neutrófilos ( $p=0,03$ ,  $r=0,56$ ).

Não foram detetadas cópias de *BCR-ABL* em 6 amostras de neutrófilos e em 7 amostras de CD34+. Destas, em apenas 1 doente não foram detetadas cópias *BCR-ABL* nos 3 tipos de amostras estudadas.

Correlacionando as diferentes populações em relação ao número de cópias *BCR-ABL* verificou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa para os valores de sangue total, neutrófilos e CD34+ (Figura 9).

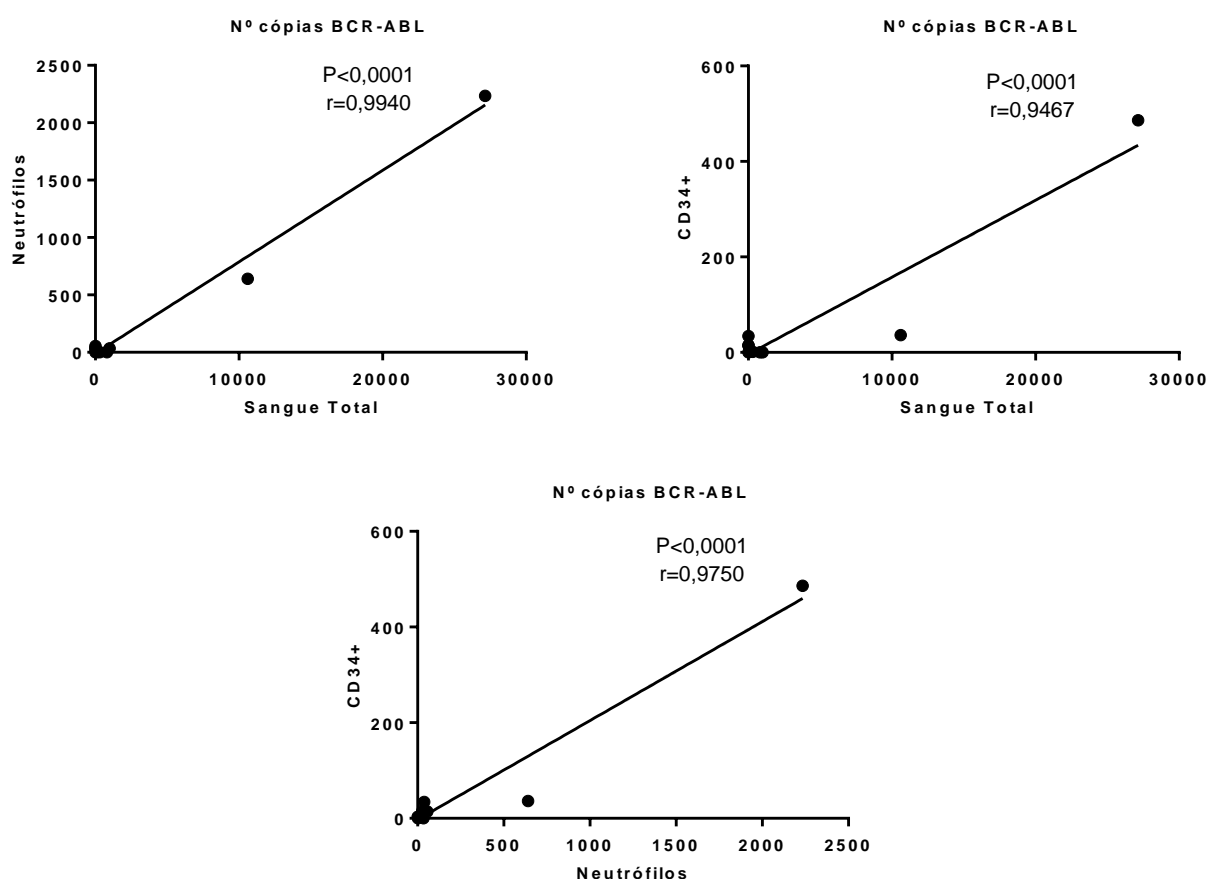


Figura 9 - Correlação entre o número de cópias *BCR-ABL* das diferentes populações.

A média de %*BCR-ABL/ABL* foi de 1,94% (0,000727-17,68366) em sangue total. Um doente apresentava uma %*BCR-ABL/ABL*>10%, 3 doentes entre 1-10%, 9 doentes <0,1% e em apenas 1 doente não foi possível determinar a %*BCR-ABL/ABL*.

Nos neutrófilos, a média de %*BCR-ABL/ABL* foi de 32,39% (0,42-123,77). Seis doentes apresentavam uma %*BCR-ABL/ABL*>10%, 2 doentes entre 1-10%, 1 doente <0,1% e em 6 doentes não foi possível determinar a %*BCR-ABL/ABL*.

Nas células CD34+, a média de %*BCR-ABL/ABL* foi de 37,3625% (0,54-109,68). Cinco doentes apresentavam uma %*BCR-ABL/ABL*>10%, 1 doente entre 1-10%, 2 doentes <0,1% e em 7 doentes não foi possível determinar a %*BCR-ABL/ABL*.

Correlacionando as diferentes populações em relação à %*BCR-ABL/ABL*, observou-se uma correlação positiva entre os valores obtidos no sangue total e neutrófilos ( $p<0,0001$ ,  $r=0,9412$ ) e uma correlação ligeira entre os valores de neutrófilos e CD34+ ( $p=0,044$ ,  $r=0,52$ ) (Figura 10).

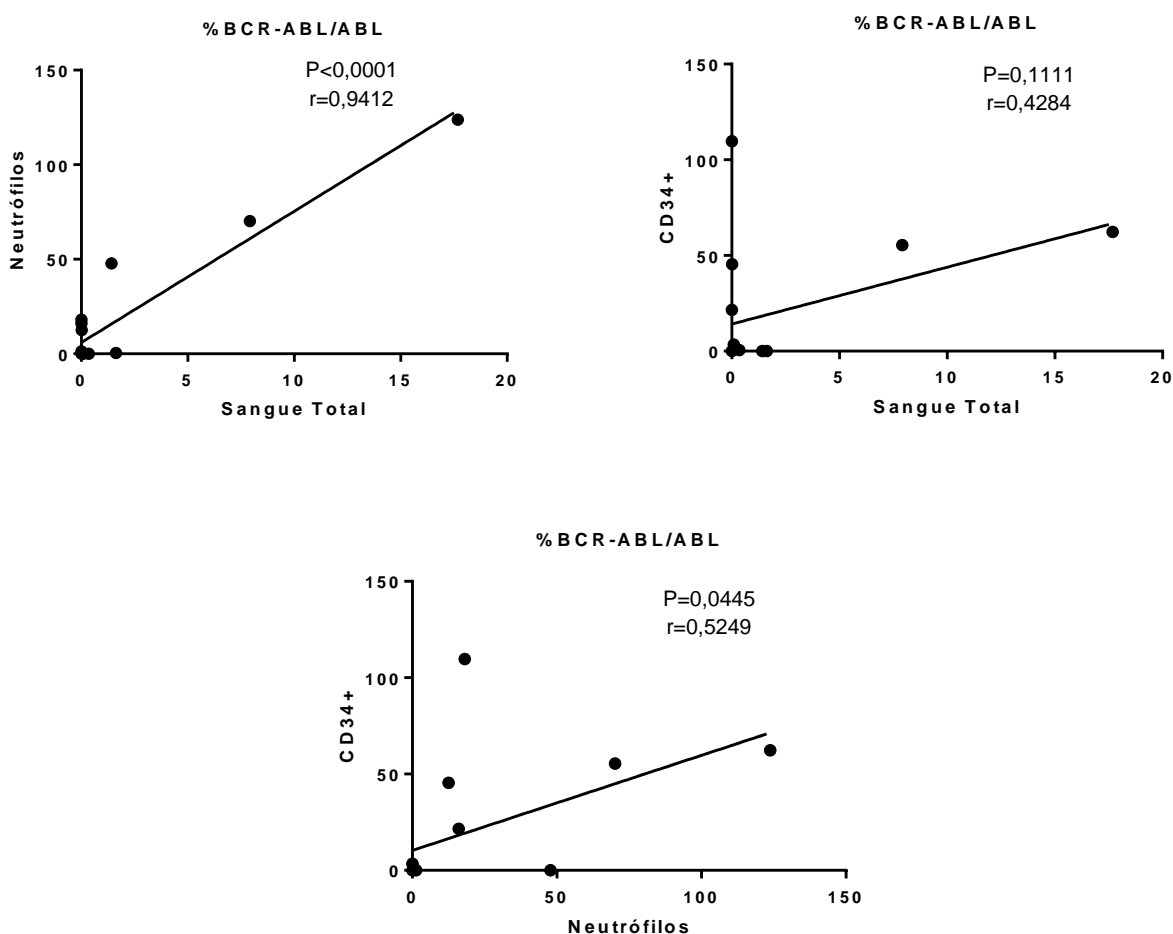


Figura 10 - Correlação entre a percentagem *BCR-ABL/ABL* das diferentes populações.

Globalmente, a %*BCR-ABL/ABL* determinada em sangue total foi inferior à obtida quando avaliada em neutrófilos e células CD34+ (Figura 11).

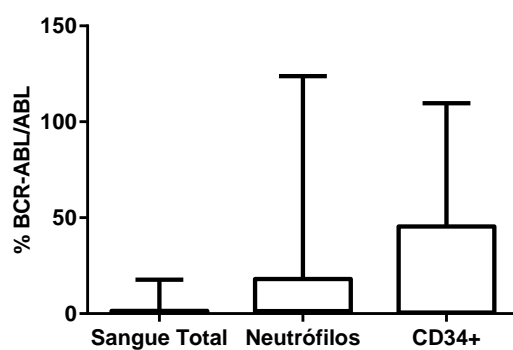


Figura 11 - Percentagem de BCR-ABL/ABL nas diferentes populações.

## 5. Discussão

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa clonal caracterizada pela presença de uma translocação recíproca entre o gene *ABL* no cromossoma 9 e o gene *BCR* no cromossoma 22, t(9;22) (q34;q11). Esta translocação promove a transcrição de um mRNA quimérico *BCR/ABL* que codifica uma proteína com atividade tirosina-quinase alterada em comparação com a proteína *ABL* normal.

Atualmente, o tratamento da LMC consiste na utilização de inibidores tirosina cinase, como o Imatinib, cuja resposta ao tratamento é avaliada ao nível hematológico, citogenético e molecular. De acordo com as recomendações da *European LeukemiaNet* (2013) [23], a resposta molecular é avaliada por RQ-PCR aos 3, 6 e 12 meses de tratamento até atingir resposta molecular major, e posteriormente de 6 em 6 meses.

Neste estudo foram incluídos 15 doentes, com LMC sob tratamento com imatinib. Em todos os doentes foi efetuada a pesquisa, identificação e quantificação de transcritos *BCR-ABL* em diferentes populações celulares: sangue total, neutrófilos e células CD34+ por PCR Multiplex, PCR Simples e RQ-PCR.

Utilizando uma técnica de PCR-Multiplex, nas amostras de sangue total, foi possível detetar transcritos *BCR-ABL* em 6 doentes (amostras 6,7,10,12,13,14). Nas amostras de neutrófilos e CD34+, por PCR Simples, foram detetados transcritos em apenas 2 doentes (amostras 6 e 7). Em 9 doentes, não foram detetados transcritos *BCR-ABL* nas amostras de CD34+, neutrófilos e sangue total. Esta técnica apenas permite identificar o tipo de transcrito do gene *BCR-ABL*, pelo que, em doentes já sob tratamento deverão ser utilizadas técnicas mais sensíveis para avaliar a expressão do gene *BCR-ABL*.

A quantificação do *BCR-ABL*, foi efetuada por RQ-PCR onde foram determinados o número de cópias do *BCR-ABL* e *ABL* das amostras de sangue total, neutrófilos e CD34+. Em todas as amostras de sangue total, o número de cópias de *ABL* foi >10000 cópias, enquanto que nas amostras de neutrófilos e CD34+, o número de cópias de *ABL* foi em média de 361 (6-1805) e 105 (2-780) cópias, respetivamente. Estas diferenças podem ser justificadas por um rendimento significativamente inferior no processo de extração de RNA nas amostras obtidas após, por separação celular, em comparação com as amostras

preparadas a partir de sangue total, em que não foi possível sintetizar a mesma quantidade de cDNA em todas as amostras.

Por *cell-sorting*, a quantidade de RNA transcrito foi em média de 0.05 µg (0.03 - 0.1 µg), enquanto que na amostras de sangue total foi transcrito 2 µg de RNA. O baixo rendimento da extração poderá ter sido devido ao tempo de processamento das amostras de *cell-sorting* e ao processo de separação celular, uma vez que o mRNA tem uma taxa de degradação rápida, refletindo-se no número de cópias de gene controle obtido. Portanto, a estabilidade do gene alvo e do gene controle pode conduzir a dados imprecisos. [38] O facto de se partir de um menor volume de amostra, para as populações celulares de neutrófilos e CD34+, em comparação com amostras de sangue total, também explica a menor quantidade de RNA obtido. Ainda assim, observou-se uma ligeira correlação entre o número de cópias de *ABL* nas amostras de sangue total e neutrófilos ( $p=0,03$ ,  $r=0,56$ ).

Relativamente ao número de cópias do *BCR-ABL*, nas amostras de sangue total, apenas 1 doente não apresentava cópias detetáveis, sendo que 8 doentes apresentavam número de cópias baixo  $<10$ . Destes, em 5 amostras de neutrófilos e 3 de CD34+, o número de cópias de *BCR-ABL* foi superior ao número de cópias quantificadas em sangue total.

Em relação à  $\%BCR-ABL/ABL$ , nas amostras de sangue total, a média foi de 2,08% (0,0007-17,684), em que 1 doente apresentava  $\%BCR-ABL/ABL > 10\%$ , 3 doentes entre 1-10%, 10 doentes  $< 0,1\%$  e 1 sem transcritos detetáveis.

Os doentes com maior percentagem de transcritos nas amostras de sangue total são aqueles que apresentam menor tempo de tratamento, pelo que, no que diz respeito à avaliação de resposta molecular, 2 doentes tinham resposta sub-ótima, 2 doentes resposta ótima, 2 doentes com RM 3.0, 1 doente com RM 4.0, 2 doentes com RM 4.5 e 6 doentes com RM 5.0.

Relativamente à  $\%BCR-ABL/ABL$  nas amostras obtidas de *cell-sorting*, a média de  $\%BCR-ABL/ABL$  foi de 32,39% (0,42- 123,8) nos neutrófilos e de 37,36% (0,54-62,31) para CD34+. Em 8 doentes, a  $\%BCR-ABL/ABL$  nas amostras de *cell-sorting* (neutrófilos e CD34+) é superior à obtida em sangue total. Ainda assim, encontrámos uma correlação estatisticamente significativa entre a  $\%BCR-ABL/ABL$  nas amostras de sangue total e neutrófilos ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,9412$ ).

É de salientar ainda, que nas células CD34+ e neutrófilos, nas amostras 1, 2 e 3, doentes com RM  $> 4.0$ , a  $\%BCR-ABL/ABL$  bem como de número de transcritos *BCR-ABL* é

---

muito superior aos resultados obtidos nas amostras de sangue total. Acreditando que a qualidade da amostra não seria determinante neste resultado, seriam resultados inesperados de obter, mas interessantes para analisar, uma vez que, no caso de estes doentes serem futuros candidatos a interromperem a terapêutica, seria relevante a interpretação destes resultados de %*BCR-ABL/ABL*.

Daqui podemos deduzir que nem sempre um número de cópias *BCR-ABL* reduzido nas amostras de sangue total é semelhante ao número cópias *BCR-ABL* nas amostras de CD34+ e neutrófilos. Quando surgem resultados discrepantes, poderão indicar que apesar de não se detetarem cópias *BCR-ABL* no sangue total, nas células CD34+ e nos neutrófilos a sua atividade mantém-se visível com o aumento do número de cópias *BCR-ABL* e, consequentemente, aumento da %*BCR-ABL/ABL*. Deste modo, provavelmente estes doentes não seriam candidatos à interrupção da terapêutica. Seria interessante efetuar uma avaliação ao longo do tempo destes doentes para verificação/validação destes factos.



## 6. Conclusão

Na LMC a monitorização do tratamento com inibidores tirosina cinase, é avaliada ao nível hematológico, citogenético e molecular [23]. A resposta molecular é dada pela % de transcritos *BCR-ABL/ABL* determinado por RQ-PCR, em amostras de sangue total ou medula óssea.

Neste estudo, que englobou 15 doentes com LMC sob tratamento com Imatinib, foram avaliados e comparados o número de cópias de *BCR-ABL* e *ABL* e %*BCR-ABL/ABL* em amostras de sangue total, neutrófilos e células CD34+.

Para dados RQ-PCR válidos, é imperativo considerar e otimizar cada fase do processo, incluindo a recolha de amostra, extração de RNA, RT, e a PCR quantitativa. A qualidade dos RNAs é extremamente importante para obter dados reprodutíveis e a consistência na colheita de amostra, de transporte, de armazenamento e manuseamento irá maximizar a precisão e fiabilidade da análise.

A capacidade de deteção de cópias do transcrito *BCR-ABL* foi bastante superior nas amostras de sangue total, em comparação com as de neutrófilos e CD34+, facto justificado pelo maior número de células utilizado, menor tempo entre a colheita e processamento, e menor manipulação da amostra em relação às amostras separadas por *cell-sorting*.

No entanto, em 3 doentes com RM>4.0, o número de cópias de *BCR-ABL* nas amostras de *cell-sorting*, foi bastante superior à obtida em sangue total. Deste modo, demonstra que, mesmo em doentes com respostas moleculares profundas, as células CD34+ apresentam expressão elevada de *BCR-ABL*.

Tendo em conta que doentes com RM>4.0 poderão ser candidatos a paragem terapêutica, a determinação da expressão de *BCR-ABL* em células CD34+ poderá ser um dado adicional importante para avaliar nestes doentes.

No entanto, serão necessários mais estudos para confirmar estes achados.

Assim, será necessária uma otimização dos procedimentos para obter uma qualidade de RNA nas amostras de *cell-sorting*, semelhante à obtida nas amostras de sangue total, que permita uma comparação mais fiável dos resultados.

No futuro, seria interessante aumentar a população em estudo e efetuar uma avaliação ao longo do tempo para validação dos resultados.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Faderl, S., M. Talpaz, Z. Estrov, S. O'BRIEN, R. Kurzrock and H. M. Kantarjian (1999). **"The biology of chronic myeloid leukemia."** The New England Journal of Medicine 10: 11.
2. Deininger, M. W. N., J. M. Goldman and J. V. Melo (2000). **"The molecular biology of chronic myeloid leukemia."** Blood 96(10): 3343-3356.
3. Frazer, R., Irvine, A. E. e McMullin, M. F. (2007). **Chronic Myeloid Leukaemia in the 21st Century.** *The Ulster Medical Journal.* 76. 8-17.
4. Hoffbrand, A. V., P. A. H. Moss and J. E. Pettit (2006). **Essential haematology,** Blackwell Pub.
5. Wong, S. e Witte, O. N. (2004). **The Bcr-Abl Story: Bench to Bedside and Back.** Annual Review of Immunology. 22. 247-306.
6. Nowell, P. C. e Hungerford, D. A. (1960). **Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia.** Science. 132. 1497-1497.
7. Rowley, J. D. (1973). **New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukemia Identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining.** Nature. 243. 290-293.
8. Daley, G. Q., Vanetten, R. A. e Baltimore, D. (1990). **Induction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the P210bcr/Abl Gene of the Philadelphia-Chromosome.** Science. 247. 824-830.
9. Rohrbacher, M. e Hasford, J. (2009). **Epidemiology of Chronic Myeloid Leukaemia (Cml). Best Practice & Research Clinical Haematology.** 22. 295-302.
10. Hehlmann, R., A. Hochhaus and M. Baccarani (2007). **"Chronic myeloid leukaemia."** The Lancet 370(9584): 342-350.
11. Lens, D; Muxi, P.; Brugnini, A *et al.* (2007) **Determinación de la mutación V617F del gen JAK2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso.** *Rev Med Urug* 23: 122-125.
12. Haferlach, T; Bacher, U; Kern, W *et al.* (2008) **The diagnosis of *BCR-ABL*-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach base don morphology, cytogenetics, and molecular markers.** *Ann Hematol* 87: 1-10.
13. Sánchez-Martín, M; Sánchez-García I. (2003) **Inhibidores de BCR-ABL como un abordaje molecular de la leucemia mieloide crónica.** *Rev Oncol* 4: Supl 2.

14. Bartram, C. R., Deklein, A., Hagemeijer, A., Vanagthoven, T., Vankessel, A. G., Bootsma, D., Grosveld, G., Fergusonsmith, M. A., Davies, T., Stone, M., Heisterkamp, N., Stephenson, J. R. e Groffen, J. (1983). **Translocation of C-Abl Oncogene Correlates with the Presence of a Philadelphia-Chromosome in Chronic Myelocytic-Leukemia.** *Nature*. 306. 277-280.
  15. Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., Deklein, A., Bartram, C. R. e Grosveld, G. (1984). **Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, Bcr, on Chromosome-22.** *Cell*. 36. 93-99.
  16. Tefferi, A. and D. G. Gilliland (2007). **"Oncogenes in Myeloproliferative Disorders."** *Cell Cycle* 6(5): 550-566.
  17. Quintás-Cardama, A., H. Kantarjian and J. Cortes (2009). **"Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia."** *Cancer Control* 16(2): 122.
  18. Advani, A. S. and A. M. Pendergast (2002). **"Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects."** *Leukemia Research* 26(8): 713-720.
  19. Foroni, L., G. Wilson, G. Gerrard, J. Mason, D. Grimwade, H. E. White, D. G. de Castro, S. Austin, A. Awan and E. Burt (2011). **"Guidelines for the measurement of BCR ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia."** *British journal of haematology*.
  20. Melo, J. V., T. P. Hughes and J. F. Apperley (2003). **"Chronic Myeloid Leukemia."** *Hematology* 2003(1): 132-152.
  21. Walz, C. and M. Sattler (2006). **"Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML)."** *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 57(2): 145-164.
  22. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Chronic Myelogenous Leukemia Version I. 2015.
  23. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF *et al.* **European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia (2013).** *Blood*. 2013; 122(6):872-884.
  24. Apperley JF. **Chronic myeloid leukaemia. The Lancet.** (2015); 385(9976): 1447–59.
  25. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, *et al.* **Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.** *Blood*. (2006);108(6):1809–20.
-

26. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, Müller MC, Kaeda JS, Foroni L, *et al.* **Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS).** *Blood.* (2010);116(19):3758–65.
  27. Noens L, Hensen M, Kucmin-Bemelmans I, Lofgren C, Gilloteau I, Vrijens B. **Measurement of adherence to BCR-ABL inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia: current situation and future challenges.** *Haematologica.* (2014);99(3):437–47.
  28. Mahon F-X, Etienne G. **Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy?** *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* (2014);20(2):310–22.
  29. Etienne G, Dulucp S, Nicolini FE, Morisset S, Fort MP, Schmitt A *et al.* **Achieving deeper molecular response is associated with a better clinical outcome in chronic myeloid leukemia patients on imatinib front-line therapy.** *Haematologica.* (2013);99(3):458–64.
  30. Hughes TP, Saglio G, Kantarjian HM, Guilhot F, Niederwieser D, Rosti G, *et al.* **Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib.** *Blood.* (2014);123(9):1353–60.
  31. Marin D, Hedgley C, Clark RE, Apperley J, Foroni L, Milojkovic D, *et al.* **Predictive value of early molecular response in patients with chronic myeloid leukemia treated with first-line dasatinib.** *Blood.* (2012);120(2):291–4.
  32. Branford S, Yeung DT, Ross DM, Prime JA, Field CR, Altamura HK, *et al.* **Early molecular response and female sex strongly predict stable undetectable BCR-ABL1, the criteria for imatinib discontinuation in patients with CML.** *Blood.* (2013);121(19):3818–24.
  33. Yeung DT, Osborn MP, White DL, Branford S, Braley J, Herschtal A, *et al.* **TIDEL-II: first-line use of imatinib in CML with early switch to nilotinib for failure to achieve time-dependent molecular targets.** *Blood.* (2015);125(6):915–23.
  34. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, *et al.* **Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program.** *Leukemia.* (2003); 17(12):2318–2357.
-

35. J. van Dongen, E. Macintyre, J. Gabert, *et al.* **Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia.** *Leukemia.* (1999); 13(12):1901-28.
  36. Cai D, Wang Y, Ottmann OG, Barth PJ, Neubauer A, Burchert A. **FLT3-ITD-, but not BCR/ABL-transformed cells require concurrent Akt/mTor blockage to undergo apoptosis after histone deacetylase inhibitor treatment.** *Blood.* 2006; 107(5):2094-2097.
  37. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, *et al.* **Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results.** *Blood.* 2006;108(1):28-37.
  38. Jones D, Kamel-Reid S, *et al.* **Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting BCR-ABL Drug Resistance Mutations in Chronic Myelogenous Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia.** *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2009; 11(1): 4-11.
  39. Kumari A, Brendel C, *et al.* **Low BCR-ABL expression levels in hematopoietic precursor cells enable persistence of chronic myeloid leukemia under imatinib.** *Blood.* 2017; 119(2): 530-540.
  40. Rousselot P, Huguet F, Rea D, *et al.* **Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years.** *Blood.* 2007;109(1): 58-60.
  41. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F *et al.* **Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial.** *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1029–35.
  42. Goh H Choi S-Y, Bang J-H, Kim S-H, Jang E-J, Kim D, *et al.* **Discontinuation of Imatinib Therapy in Chronic Myeloid Leukemia Patients with Sustained Complete Molecular Response (CMR4.5).** *ASH Annu Meet Abstr.* 2011;118(21):2763.
  43. Matsuki E, Ono Y, Sakurai M, Kunimoto H, Ishiwaza J, Shimizu T *et al.* **Discontinuation of Imatinib in Patients with CML and Sustained Complete Molecular Response (CMR) for Over 2 Years in Japanese Population - An Interim Analysis of KEIO STIM Study.** *ASH Annu Meet Abstr.* 2011;118(21):3765.
-



44. Rea D *et al.* **Discontinuation of Dasatinib or Nilotinib in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients (pts) with Stable Undetectable Bcr-Abl Transcripts: Results From the French CML Group (FILMC).** ASH Annu Meet Abstr. 2011;118(21):604.
45. Takahashi N, Kyo T, Maeda Y, Takashi S, Usuki K, Kawaguchi T *et al.* **Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia.** *Haematologica*. 2012;97(6):903–6.
46. Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarzer AP, Arthur C, Yeung DT *et al.* **Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study.** *Blood*. 2013;122(4):515–22.